

## 緑膿菌に対するスルベニシリンとディベカシンの併用効果における電顕観察

著者	青沼 清一
号	1914
発行年	1987
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/20086">http://hdl.handle.net/10097/20086</a>

氏 名（本籍）                      あお                      ぬま                      せい                      いち  
青                      沼                      清                      一

学 位 の 種 類                      医                      学                      博                      士

学 位 記 番 号                      医                      第                      1 9 1 4                      号

学位授与年月日                      昭 和 62 年    9    月 30 日

学位授与の要件                      学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴                      昭 和 52 年    3    月  
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目                      Electron Microscopy of Pseudomonas aeru-  
ginosa Treated with Sulbenicillin and Dibe-  
kacin  
（緑膿菌に対するスルベニシリンとディベカシンの併用効果における電顕観察）

（主 査）

論 文 審 査 委 員                      教授 今 野                      淳                      教授 滝 島                      任

教授 菅 村 和 夫

## 論文内容要旨

緑膿菌感染症の多くは compromised host に起こり、したがって、その治療には殺菌を目的とした化学療法が望まれる。現在では抗緑膿菌性  $\beta$ -ラクタム剤とアミノグリコシド剤の併用療法が行われており、in vitro での殺菌相乗作用の報告も多い。この研究は、緑膿菌に対するスルベニシリンとディベカシンの併用効果の作用機作を知る目的で、標準株を使って、主に電子顕微鏡を用いた形態学的観察により行われた。

日本化学療法学会標準法により測定した緑膿菌の標準株 *Pseudomonas aeruginosa* IAM 1007 に対するスルベニシリンの最小発育阻止濃度 (MIC) は  $200 \mu\text{g/ml}$  で、ディベカシンの MIC は  $0.78 \mu\text{g/ml}$  であり、またスルベニシリン  $25 \mu\text{g/ml}$  とディベカシン  $0.2 \mu\text{g/ml}$  の併用でも発育が阻止されており相乗作用が認められた。

次いで両薬剤の殺菌作用を観察した。 $6 \times 10^7$  CFU/ml の菌液にスルベニシリン  $200 \mu\text{g/ml}$  (1 MIC),  $25 \mu\text{g/ml}$  (1/8 MIC) を単独で作用させると4時間後の生菌数は接種菌数と同レベルかやや増加に止まるのに対し、ディベカシン  $0.39 \mu\text{g/ml}$  (1/2 MIC) 存在下では生菌数が 1/10 に減少して殺菌作用がみられた。さらにスルベニシリン 1/8 MIC とディベカシン 1/2 MIC の共存下では4時間後の生菌数が 1/1000 に減少し、この濃度で両薬剤間に殺菌相乗作用が観察された。4時間の薬剤作用後、薬剤を除去して菌の再増殖の態度をみると、スルベニシリン 1/8 MIC および 1 MIC 単独作用菌、ディベカシン 1/2 MIC 単独作用菌は、薬剤除去後ただちに増殖を開始し、生菌数は1時間後には3倍となり、その後の1時間で急激に増加して3時間後には30~70倍となった。これに対しスルベニシリン 1/8 MIC とディベカシン 1/2 MIC 併用作用菌は、薬剤除去後2時間後に生菌数は2倍に、3時間後においても6倍程度の増加に止まっており、著しい再増殖抑制効果が認められた。

電子顕微鏡を用いた形態学的観察を行った。*Pseudomonas aeruginosa* IAM 1007 の  $6 \times 10^7$  CFU/ml の菌液に薬剤を作用させた後、遠沈・洗滌・集菌した。これをメッシュに塗抹して0.5%酢酸ウランで陰性染色を施し、全菌像観察用とし、またオスミウムで固定した菌を0.5%酢酸ウランで処理した後エタノール系列で脱水してエポキシに包埋してミクロトームで超薄切片とし、後染色後、日立HS-8透過型電子顕微鏡で観察した。

スルベニシリン  $200 \mu\text{g/ml}$  (1 MIC) 2時間の作用で、菌体は伸長化し、periplasm の拡大と peptidoglycan 層の融解、一部の菌では spheroplast 形成もみられた。しかし外膜は良好に保存されており、菌体の破壊・溶菌像は、ほとんどみられなかった。

ディベカシン  $12.5 \mu\text{g/ml}$  (16 MIC) 2時間の作用では、蛋白合成阻害作用を示唆する ribo-

some 顆粒変性像や核の集中化と共に、菌体表層において外膜の突起形成が、また菌の一端で菌膜の破壊による内容物遊出像がみられた。このディベカシンの緑膿菌の表層構造に対する作用は、機械的破壊で得られた細胞壁にディベカシンを作用させた際にも外膜の遊出像がみられたことから、これは外膜に対する直接作用であることを既に報告している。

先にスルベニシリン 200  $\mu\text{g/ml}$  を 2 時間作用させた後、遠沈洗滌し、これにディベカシン 0.78  $\mu\text{g/ml}$  を 2 時間作用させると、菌体は著しく伸長化すると共に表面は粗となり突起形成や多数の穴が観察され、溶菌像が目立った。

逆に、先にディベカシン 0.39  $\mu\text{g/ml}$  を 2 時間作用させた後、遠沈洗滌し、これにスルベニシリン 25  $\mu\text{g/ml}$  を 2 時間作用させると、ディベカシン前処置のない菌に同濃度のスルベニシリンを 2 時間作用させた場合に比較し、菌体は著しく伸長化した。

さらに、スルベニシリン 25  $\mu\text{g/ml}$  (1/8 MIC) とディベカシン 0.39  $\mu\text{g/ml}$  (1/2 MIC) を同時併用で 2 時間作用させた菌は、著しく伸長化し、表面は粗となり突起形成や外膜の断裂がみられ、溶菌しているものが多かった。

以上の実験成績から、緑膿菌に対してスルベニシリンは菌体の伸長化、peptidoglycan 層の変性融解を起こすが、外膜の障害は少なく溶菌には至らない。一方、ディベカシンは蛋白合成阻害作用と共に、外膜に対して直接破壊的に作用する。ディベカシン前処置で外膜に軽微な損傷が起こると、スルベニシリンの菌体内への侵入が容易となって peptidoglycan 層に対する作用が増強され、またスルベニシリン前処置で peptidoglycan 層が脆弱化すると、これと部分的に結合している外膜のディベカシンによる直接破壊作用が増強される両薬剤を MIC 以下の濃度であっても同時に作用させると、互いにその作用を増強し合って菌体表層を破壊して溶菌に至ると考えられる。このことが両薬剤同時併用による著しい殺菌作用の増強と、死滅を免がれた菌も薬剤除去後、速やかに再増殖を開始し得ないことにつながると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

緑膿菌感染症の治療には殺菌を目的とした化学療法が望まれ、現在では主に抗緑膿菌性 $\beta$ -ラクタム剤とアミノグリコシド剤の併用療法が行われており、*in vitro*での殺菌相乗作用の報告も多い。

著者は、 $\beta$ -ラクタム剤としてスルベニシリンを、アミノグリコシド剤としてディベカシンを選び、両薬剤の*in vitro*併用効果の作用機作を知る目的で、緑膿菌の標準株を使って、電子顕微鏡による形態学的観察を行なった。

*P. aeruginosa* IAM 1007 に対しスルベニシリンは、菌体を伸長化し、一部 peptidoglycan 層の融解をひき起こすが、外膜は良好に保存されており、溶菌像はほとんどみられない。一方、ディベカシンの作用は、蛋白合成阻害作用を示唆する ribosome 顆粒変性像や核の集中化がみられると共に、菌体表層において外膜の突起形成や粗面化、また菌の一端で菌膜の破壊から溶菌している像が多く見られる。著者は緑膿菌を機械的に破壊して得られた細胞壁にディベカシンを作用させた際にも外膜の遊出像がみられたことから、ディベカシンの外膜に対する作用は直接作用であることを既に報告している。さらにスルベニシリンの菌体伸長化と peptidoglycan 融解作用は、低濃度のディベカシン前処理により増強され、またディベカシンの外膜に対する破壊的変化も、スルベニシリンの前処理により増強される。そこで最小発育阻止濃度 (MIC) 以下の低濃度で両薬剤を同時に作用させると、菌体は著しく伸長化し、表層の破壊的変化は顕著となり、大多数の菌は溶菌していた。

以上の実験成績から、著者は、緑膿菌に対するスルベニシリンとディベカシンの*in vitro*併用効果の作用機作について、以下のごとく考察した。

低濃度のディベカシンが緑膿菌の外膜に軽微な損傷を起こすと、スルベニシリンの菌体内への侵入が容易となり、細胞質膜上にある peptidoglycan 合成酵素である penicillin-binding protein に結合して、菌体の伸長化と peptidoglycan 層の脆弱化をひき起こす。一方、外膜と一部で結合している peptidoglycan 層の脆弱化により、その結合が弱くなるとディベカシンの外膜の破壊的変化は促進される。その結果、細胞壁は細胞質の圧力に抗し切れず溶菌する。

本研究は、ディベカシンの緑膿菌の外膜に対する直接作用の前報をもとに、スルベニシリンとの*in vitro*併用効果の作用機作の解明を試み、電子顕微鏡による形態学的観察により、両薬剤が緑膿菌の細胞壁の2つの部位、すなわち外膜と peptidoglycan 層に、互いにその作用を増強し合って破壊的に作用するため緑膿菌は溶菌し死滅するとした新知見を得たものであり、日常、臨床応用されている併用療法の理論的根拠を示すものであり、学位授与に値するものと認める。